

**Rizóbios Associados às Raízes
de Pau-Rainha (*Centrolobium
paraense*TUL.) em Solos de
Roraima**

***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Roraima
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

Documentos 53

**Rizóbios Associados às Raízes
de Pau-Rainha (*Centrolobium
paraense*TUL.) em Solos de Roraima**

***Alexandre Cardoso Baraúna*
Gilmaria Maria Duarte Pereira
Krisle da Silva
Jerri Édson Zilli***

****Parte da monografia do primeiro autor***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Roraima

Rodovia BR174, Km 8 - Distrito Industrial

Cx. Postal 133 - CEP. 69.301-970

Boa Vista | RR

Fone/Fax: (095) 4009.7100

www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Oscar José Smiderle

Secretário-Executivo: Aloísio Alcântara Vilarinho

Membros: Karine Dias Batista

Krisle da Silva

Edvan Alves Chagas

Roberto Dantas de Medeiros

Hyanameika Evangelista de Lima

Elisângela Gomes Fidelis de Moraes

Cássia Ângela Pedrozo

Normalização Bibliográfica: Jeana Garcia Beltrão Macieira

Revisão Gramatical: Luiz Edwilson Frazão, Clarice Monteiro Rocha e Vanessa Damasceno

Editoração Eletrônica: Gabriela de Lima

1ª edição (2014)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação da Publicação (CIP)

Embrapa Roraima

Baraúna, Alexandre Cardoso.

Rizóbios Associados às Raízes de Pau-Rainha (*Centrolobium paraense* TUL.) em
Solos de Roraima / Alexandre Cardoso Baraúna, Gilmaria Maria Duarte Pereira, Krisle da
Silva, Jerri Édson Zilli. - Boa Vista, RR: Embrapa Roraima, 2014.

16 p. -. (Documentos / Embrapa Roraima, 53).

1. Microorganismo. 2. Fixação Biológica de Nitrogênio. I. Pereira, Gilmaria Maria Duarte.
II. Silva, Krisle da. III. Zilli, Jerri Édson. IV. Embrapa Roraima.

CDD: 631.4

Autores

Alexandre Cardoso Baraúna

Aluno de Doutorado; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa Ciência do Solo, Seropédica, RJ

Gilmara Maria Duarte Pereira

Engenheira Agrônoma, Professora Universidade Federal de Roraima - UFRR

Krisle da Silva

Engenheira Agrônoma, Dra. Pesquisadora Embrapa Roraima

Jerri Édson Zilli

Engenheiro Agrônomo, Ph D. Pesquisador Embrapa Agrobiologia

Sumário

Introdução.....	06
Materiais e Métodos.....	07
Resultados e Discussão.....	09
Considerações Finais.....	13
Referências.....	14

Rizóbios Associados às Raízes de Pau-Rainha (*Centrolobium paraense*TUL.) em Solos de Roraima

Alexandre Cardoso Baraúna

Gilmara Maria Duarte Pereira

Krisle da Silva

Jerri Édson Zilli

Introdução

A Amazônia é um dos mais ricos ecossistemas do planeta e possui riquezas biológicas pouco exploradas, principalmente em se tratando de microrganismos (LOPES et al., 2005; REIS et al., 2005). Os rizóbios constituem um grupo de microrganismos que se associam de forma específica com plantas da família Leguminosae, apresentando estruturas radiculares e, excepcionalmente, no caule, denominados nódulos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Esta interação é particularmente importante nos estágios iniciais de desenvolvimento dessas plantas promovendo crescimento vegetal em virtude de um aporte natural de nitrogênio, em um processo conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN).

As espécies de leguminosas arbóreas noduladas e micorrizadas exercem um importante papel em sistemas naturais (FRANCO; CAMPELLO, 2005), pois em geral esses tipos de simbioses representam benefícios ao desenvolvimento da planta e à melhoria do ambiente, uma vez que favorecem a disponibilidade de macronutrientes essenciais à vida como o nitrogênio (DIAS et al., 2007) e o fósforo (CHAGAS JUNHOR et al., 2010), os quais são encontrados em baixas quantidades nos solos amazônicos. Essas espécies vegetais contribuem significativamente para constituição da matéria orgânica do solo, além de exercerem funções protetoras do solo contra os efeitos erosivos que são extremamente danosos à dinâmica microbiana (FRANCO; CAMPELLO, 2005), sendo, portanto, frequentemente estudadas em programas de reflorestamento ou recuperação de áreas degradadas (CHADA et al., 2004) agilizando o processo de sucessão vegetal.

Centrolobium paraense Tul. é uma leguminosa arbórea da subfamília Papilionoideae, conhecida popularmente como pau-rainha, que possui a capacidade de formar nódulos e podendo se beneficiar da FBN (SOUZA et al., 1994). Esta espécie de alto potencial madeireiro ocorre em ilhas de mata no Estado de Roraima (KAMINSKI, 2004) e é geralmente utilizada na construção de moradias indígenas, na construção de móveis, como combustível, para fins medicinais e para extração de corante (KAMINSKI, 2004; PEDREIRA et al., 2010). Entretanto, este recurso vegetal encontra-se ameaçado pelas pressões de ações antrópicas como a extração indiscriminada da madeira para lenha, ocupação de áreas dentro da mata e abertura de áreas para formação de pastagem.

Apesar do potencial, a FBN foi pouco estudada em plantas de pau-rainha, havendo apenas relato de nodulação (SOUZA et al., 1994), porém, pouco se sabe sobre a diversidade de rizóbios associados a esta planta.

O objetivo deste estudo foi isolar e avaliar a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio em simbiose com raízes de pau-rainha nos solos de Roraima.

Material e Métodos

Área de estudo e amostragem

Foram realizadas seis coletas de solos e sementes de pau-rainha, em propriedades particulares, durante o mês de fevereiro de 2010, sendo duas no município de Bonfim (Vila São Francisco 1 - PR1 e Vila São Francisco 2 - PR2), duas em Normandia (Fazenda Central - PR3 e Fazenda Novo Destino - PR4) e duas em Mucajaí (Fazenda Pau-rainha - PR5 e Fazenda Sr. Bacabeira - PR6).

Em cada área de coleta foram retiradas cinco amostras simples de aproximadamente 200 g a dois metros de distância de uma planta de pau-rainha adulta para compor uma amostra composta de 1 kg. Em seguida, frações de cada amostra de solo foram destinadas à análise de macronutrientes e matéria orgânica segundo Silva (1999) realizado no Laboratório de Análise de Solos e Plantas da Embrapa-RR. O restante do solo foi destinado à análise microbiológica no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Roraima para instalação de experimento para obtenção de nódulos.

Obtenção de nódulos e isolamento dos rizóbios

Cerca de 1 kg de cada amostra de solo coletado nas áreas de estudo foram misturados com areia lavada e autoclavada (1:1) e distribuído em três vasos com capacidade de 2 kg (Figura 1). Nestes vasos foram semeadas cinco sementes, sem quebra de dormência, e após a germinação foi realizado o desbaste permanecendo duas plantas por vaso. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado durante o período de 45 a 60 dias e as plantas foram irrigadas com água destilada. Ao final do experimento as plantas foram retiradas dos vasos e as raízes lavadas para coleta dos nódulos. Os nódulos coletados foram armazenados em recipientes contendo sílica-gel até o isolamento.



Figura 1. Obtenção dos nódulos utilizando plântulas de *Centrolobium paraense* cultivadas em solos de ilha de mata de Roraima.

Para o isolamento, os nódulos foram reidratados por uma hora em água destilada e em seguida, procedeu-se a desinfestação superficial com etanol 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio a 3-5% por cinco minutos e sucessivas lavagens em água esterilizada. Os nódulos foram macerados em placas de Petri contendo meio de cultura YMA (VINCENT, 1970) onde foi adicionado 10 mL L⁻¹ de vermelho congo a 0,25%. As placas foram incubadas a 28° C em incubadora tipo BOD por um período máximo de dez dias. As colônias de coloração esbranquiçada foram repicadas em placas contendo meio de cultura YMA com indicador azul de bromotimol (0,5%) e novamente incubadas para a purificação dos isolados. Após purificação os isolados foram mantidos em tubos contendo meio YMA sólido mais adição de óleo mineral e criopreservados em meio líquido acrescido de glicerol 20% e armazenado a -20oC.

Caracterização morfofisiológica

Os isolados purificados foram caracterizados após o surgimento de colônias isoladas. A caracterização foi realizada de acordo com as seguintes características: tempo de crescimento em dias (1–3 rápido, 4-5 intermediário, 6-10 lento); pH do meio (ácido, neutro ou alcalino); diâmetro da colônia (pequena média e grande); forma da colônia (circular, irregular, puntiforme); elevação da colônia (plana, elevada, côncava, convexa, protuberante); borda da colônia (lisa, ondulada, lombada, dentada, filamentosa); superfície da colônia (lisa, rugosa); produção de muco (pouca, moderada, abundante); transparência do muco (homogêneo ou heterogêneo) e aparência do muco (transparente, translúcido e opaco).

Capacidade de nodulação dos isolados

Após o isolamento e caracterização morfológica foram selecionadas 40 isolados com perfis morfológicos diferenciados para confirmar a capacidade de nodulação utilizando-se o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) como hospedeiro, por se tratar de uma cultura de ciclo curto e promísua à associação com várias espécies de bactérias nodulantes (XAVIER et al., 2006). Para cada isolado selecionado e controle negativo, foram preparados três vasos utilizando copos descartáveis com capacidade de 500 mL contendo substrato de areia com vermiculita (2:1) esterilizados em autoclave a 120°C por 1 h. Os vasos foram colocados sobre potes de plásticos com capacidade de 250 ml onde foi fornecida água estéril ou solução nutritiva (Figura 2).

Em seguida as sementes de feijão-caupi foram desinfestadas em etanol por 30 seg, seguido de 5 min em hipoclorito de sódio (1%) e sucessivas lavagens em água destilada estéril. Foram semeadas cinco sementes por vaso que sendo irrigadas diariamente com água destilada estéril, e quatro dias após a emergência, procedendo-se o desbaste deixando-se duas plântulas por vaso.

Os isolados foram cultivados em meio YM por 72 horas sob agitação de 150 rpm a 28°C. Após este período 1 ml do meio de cultura contendo cada isolado foi inoculado em cada plântula de feijão-caupi. As plantas foram mantidas em casa de vegetação durante 20 dias sendo irrigadas com aproximadamente 100 ml de solução nutritiva de Norris (NORRIS; T'MANNETJE, 1964) sem nitrogênio a cada dois dias. Findo esse período, as plantas foram retiradas e as raízes lavadas para verificação de presença ou ausência de nódulos.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação utilizando o delineamento experimental inteiramente casualizado.



Figura 2. Experimento conduzido em casa de vegetação para avaliação da capacidade de nodulação dos isolados bacterianos obtidos de nódulos de pau-rainha (*Centrolobium paraense*) inoculados em feijão-caupi.

Caracterização genotípica por BOX-PCR

Os isolados que foram capazes de formar nódulos em feijão-caupi foram caracterizados genotipicamente pela técnica de BOX-PCR. Para isto, os isolados foram cultivados em meio YM líquido por 72 horas sob agitação de 150 rpm, a 28°C. Após este período, 1 ml do meio foi utilizado para a extração do DNA utilizando o kit de extração de DNA genômico RBC® Bioamérica (cat. YGB300). A amplificação pela técnica de BOX-PCR foi realizada como descrito por Hungria et al. (2008) utilizando o oligonucleotídeo BOX - 5'CTACGGCAAGGCGACGCTGACG3' (Alpha DNA™). As reações foram submetidas à amplificação em termociclador Mastercycler Gradient® (Eppendorf™) e os perfis de bandas das amostras foram obtidos através da eletroforese em gel de agarose ultra pura (Invitrogen™) a 2% diluído em tampão TBE 1 X. Foi utilizado o 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen™) como marcador, e foram utilizadas amostras amplificadas das estirpes padrões de *Bradyrhizobium elkanii* (BR113), *Bradyrhizobium japonicum* (BR 114) e *Rhizobium tropici* (BR 322) para comparação com os isolados dos nódulos de pau-rainha. A eletroforese foi ajustada para aproximadamente 5 h a 120V e o gel registrado em sistema de foto-documentação. A análise de agrupamento foi realizada no programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, v.6.1) adotando algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (SNEATH; SOKAL, 1973) e coeficiente de Jaccard (JACCARD,1912).

Resultados e Discussão

Análise do solo e número de nódulos obtidos

A análise de solo mostrou que o pH em todas as áreas de coleta apresentava-se ácido, variando de 4,9 a 6,0 (Tabela 1). Tais resultados eram esperados visto que, em geral, os solos da Amazônia tem uma forte tendência em apresentar pH ácido devido a lixiviação das bases trocáveis (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A variação de pH nesta faixa parece influenciar o processo de nodulação das raízes, sendo que há tendência de diminuição no número de nódulos à medida que o pH diminui a valores próximos de 4 e aumentam em condições de pH mais elevados, próximo da neutralidade. Esta tendência foi relata por Souza et al. (1994) quando observaram o processo de nodulação em 100 espécies de leguminosas da Amazônia e constaram a presença de nódulos mesmo em áreas com pH do solo em torno de quatro, havendo, no entanto, um retardo no estabelecimento da simbiose. Este fato explica em parte a baixa quantidade de nódulos obtidos nas áreas Fazenda Central e Fazenda Pau-rainha. Este resultado indica que outros fatores como, por exemplo, a densidade de rizóbios nas diferentes áreas estudadas e a colonização por fungos micorrízicos arbusculares (FMA), podem estar influenciando o processo de nodulação nas ilhas de mata de Roraima e ressalta, portanto, a necessidade de estudos abordando a composição do solo e a biodiversidade microbiana destes ecossistemas.

Entretanto, a análise do solo da Fazenda Novo Destino apresentou pH 5,0 e nodulação elevada (Tabela 1), indicando haver rizóbios tolerantes à acidez nesta área. Esta característica é altamente desejável para seleção de rizóbios eficientes sob condições de campo (HARA; OLIVEIRA, 2004).

De modo geral, a análise do solo de onde foram capturadas os isolados demonstra que estes são de baixa fertilidade natural, que é uma característica predominante nos solos de Roraima. Quanto ao teor de matéria orgânica, para a maioria das áreas de coleta, os solos apresentaram teores medianos, isto devido a amostras se encontrarem em ilhas de mata.

Isolamento e caracterização de rizóbios em plântulas de pau-rainha

Após a realização do ensaio *in vitro* utilizando plântulas de pau-rainha como planta isca, foi possível a obtenção de 334 nódulos, todos globosos e de coloração marrom. A obtenção de nódulos com esta coloração já foi descrita por Souza et al. (1994) ao trabalhar com várias espécies de leguminosas que ocorrem na Amazônia. Observou-se uma grande variação em relação à quantidade de nódulos das diferentes amostras de solo. Este fato pode ser consequências das diferenças da composição biológicas

Tabela 1. Análise química, matéria orgânica e número de nódulos de amostras de solo de ilhas de mata de Roraima utilizadas para capturar isolados bacterianos capazes de nodular pau-rainha (*Centrolobium paraense* Tul.)

Área de coleta	pH em água	Complexo sortivo									M.O. g kg ⁻¹	N°. nódulos
		cmol _c dm ⁻³					mg dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³				
		Ca	Mg	K	Al	H + Al	P	SB	CTCt	CTCe		
Área 1 Vila São Francisco (PR1)	5,8	1,57	0,67	0,21	0,01	-	1,68	2,45	2,4	2,5	19,5	69
Área 2 Vila São Francisco (PR2)	6,0	3,42	0,89	0,26	0,01	-	2,96	4,57	4,6	4,6	28,7	26
Fazenda Central (PR3)	5,1	1,69	0,68	0,28	0,15	4,64	1,78	2,65	7,3	2,8	20,8	19
Fazenda Novo Destino (PR4)	5,0	1,19	0,27	0,13	0,25	2,66	2,88	1,59	4,2	1,8	7,1	68
Fazenda Pau-Rainha (PR5)	4,9	1,35	1,06	0,15	0,66	5,61	1,68	2,56	8,2	3,2	20,8	20
Fazenda Sr. Bacabeira (PR6)	6,0	4,92	0,91	0,21	0,06	3,07	26,10	6,04	9,1	6,1	29,2	133
Total												334

e físico-químicas de cada solo. A presença de certos grupos de microrganismos do solo pode influenciar positivamente a colonização das raízes de leguminosas por rizóbios. Marques et al. (2001) demonstraram que FMA estimulam o processo de nodulação em leguminosas arbóreas. Enquanto que fatores como a tensão da água, teor de O₂ no nódulo, temperatura e pH do solo, salinidade, toxinas e predadores são determinantes na nodulação ou fixação biológica do N₂ por leguminosas, ao nível de retarda ou mesmo inibir o estabelecimento da simbiose (KAMICKER; BRILL, 1986).

Neste trabalho pode-se descartar a variável especificidade dos rizóbios do solo natural e os genótipos das plantas, uma vez que as sementes de pau-rainha foram coletadas da mesma área do solo utilizado. A falta de parâmetros de percentagem de nodulação natural de *C. paraense* dificulta este tipo de comparação. Por isso, são necessários estudos de nodulação natural em condições de campo, visando contribuir com informações essenciais que possibilitem a maximização da FBN por esta simbiose em condições naturais.

Entretanto, Souza et al. (1994) demonstraram que algumas leguminosas arbóreas, incluindo *C. paraense*, apresentam dificuldades ou mesmo ausência de nodulação em condições de campo, sendo que o mesmo não ocorre quando cultivadas em condições de viveiro. Esta informação reforça a teoria de agentes limitantes ao crescimento de rizóbios associados ao pau-rainha em condições naturais. Por isso, a produção de mudas em viveiros inoculadas com rizóbios eficientes pode ser uma alternativa para melhorar o desenvolvimento desta espécie e integrar programas de reflorestamento de áreas degradadas (FRANCO; CAMPELLO, 2005) e utilização em sistemas silvo-pastoris (DIAS et al., 2007).

Dos 334 nódulos, 51,7% representavam nódulos viáveis que permitiram o obter de 178 isolados em meio de cultura YMA. Sendo que 41 foram isoladas a partir dos solos da área 1 (PR1) e área 2 (PR2) da vila São Francisco localizadas em ilhas de mata do município de Bonfim, 63 em Normandia nas propriedades Fazenda Central (PR3) e Fazenda Novo Destino (PR4) e 74 em Mucajaí nas propriedades Fazenda Pau-rainha (PR5) e Fazenda Sr. Bacabeira (PR6) (figura 3). Isto pode estar relacionado à formação de nódulos não-ativos, os quais foram induzidos pelas bactérias nodulíferas e o processo de infecção e colonização não foram completados ou mesmo a mortalidade dos nódulos após a serem armazenados em sílica-gel.

A caracterização dos isolados bacterianos obtidos a partir de nódulos de *C. paraense* revelou uma predominância de estirpes com perfis fenotípicos semelhantes do gênero *Bradyrhizobium* apresentando crescimento lento, alcalinização do meio de cultura, coloração branca e média a pouca quantidade de muco produzido, representando 85 % do total de isolados. Esta relação entre leguminosas arbóreas e rizóbios pertencente ao gênero *Bradyrhizobium* é bastante comum, sendo reportada em vários trabalhos (STAMFORD et al., 1996; MOREIRA, 1997; BARBERI et al., 1998). Também foram isoladas estirpes de crescimento

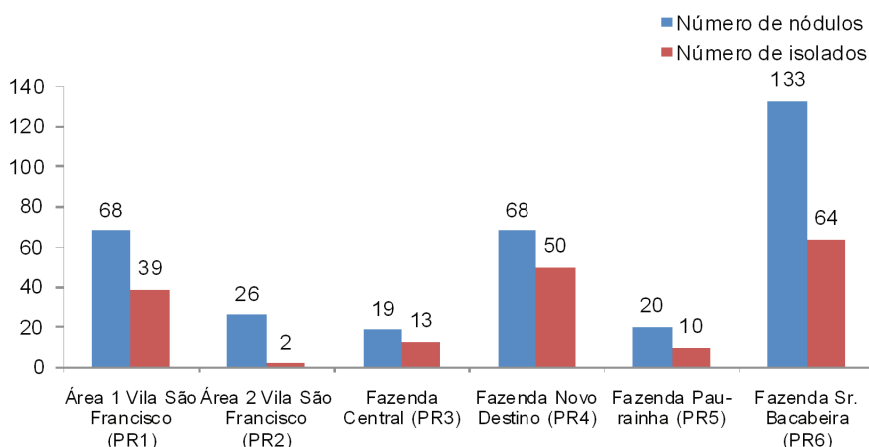


Figura 3. Distribuição quantitativa de nódulos e isolados bacterianos obtidos de solos coletados em áreas de ilhas de mata localizadas em três municípios do Estado de Roraima.

intermediário, alcalinizantes, colônias brancas e pouca produção de muco, características do gênero *Azorhizobium* e estirpes com crescimento rápido e acidificantes, características dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* ou *Mesorhizobium*.

A partir do dendrograma gerado foi possível constatar a formação de nove grupos considerando similaridade de 99,6% (Figura 6). Dentre estes, o grupo 5 (G5) destacou-se pela homogeneidade, incluindo isolados bacterianos a partir dos solos coletados nos municípios de Bonfim, Mucajaí e Normandia e por agrupar maior número de isolados (151). Este grupo apresenta 10 perfis que compartilharam características como crescimento lento, alteração do pH do meio para alcalino, colônia pequena, circular, plana e lisa, pouca a moderada produção de muco opaco e homogêneo. A maioria dos isolados obtidos a partir das amostras de solo das áreas Vila São Francisco 1, Fazenda Novo Destino, Fazenda Pau-rainha e Fazenda Sr. Bacabeira foram agrupados no G5, obtendo percentual de inclusão de 87,2%, 80%, 100% e 100% respectivamente.

A predominância de rizóbios de crescimento lento em áreas de mata é fato bastante conhecido, sendo reportado há três décadas por Stamford et al. (1996) que evidenciaram a predominância de 90% de rizóbios de crescimento rápido em áreas semiáridas. Enquanto que em áreas de mata os rizóbios de crescimento lento prevaleciam em 100%. Este fato parece estar relacionado com as condições edáficas de cada ambiente, sendo as áreas de mata caracterizada pela maior quantidade de matéria orgânica, temperaturas amenas, maior teor de umidade, condições que favorecem rizóbios com metabolismos mais lentos. A espécie *C. paraense* tem demonstrado especificidade a estas bactérias, semelhantemente com as demais leguminosas arbóreas da Amazônia (SOUZA et al., 1994). Por outro lado, a maioria os isolados bacterianos das áreas 2 da vila São Francisco e Fazenda Central agruparam-se nos grupos G1, G2, G3, G6 e G9 apresentando características predominantemente de crescimento rápido ou intermediário (Figura 7). As estirpes padrões de *Bradyrhizobium elkanii* (BR 113), *B. japonicum* (BR 114) e *R. tropici* (BR 322) formaram grupos independentes sendo que apenas o isolado PR2-10 agrupou-se com BR322.

As amostras de solo das áreas Fazenda Sr. Bacabeira e Fazenda Central tiveram maior diversidade de rizóbios associados a *C. paraense* tendo isolados distribuídos em cinco grupos cada. Baseado nas características morfofisiológicas dos 178 isolados foram selecionadas 40 bactérias representativas dos nove grupos formados (Tabela 2).

Avaliação da capacidade de nodulação

Foram avaliadas 40 bactérias selecionadas de acordo com suas características morfofisiológicas (Tabela 2). Dos 40 isolados testados quanto à capacidade de nodulação, apenas os isolados PR1-11, PR2-10, PR2-25 e PR4-31 não foram capazes de nodular. Isso é um indicativo de que estes isolados não pertencem ao grupo dos rizóbios ou não estabelecem simbiose com a espécie de leguminosa hospedeira utilizada, sendo necessária a realização da inoculação destes isolados em plântulas de pau-rainha para confirmação desta hipótese. Desta forma, é provável que a espécie *C. paraense* se beneficie efetivamente do processo de FBN quando inoculadas com estes isolados.

Em uma visão mais ampla, o reconhecimento destas bactérias isoladas pode representar o primeiro passo para desenvolvimento de tecnologias que promovam a sustentabilidade de ecossistemas naturais ameaçados pela redução dessas espécies na savana roraimense. A recomendação de produção de mudas em viveiros inoculadas com estirpes eficientes no processo de FBN para utilização em programas de reflorestamento, seria uma forma de se evitar este problema. Futuros testes deverão ser conduzidos para verificar a eficiência destas bactérias em simbiose com pau-rainha.

Análise de agrupamento dos isolados bacterianos a partir da técnica de Box-PCR

Os 36 isolados bacterianos que confirmaram a capacidade de nodulação em feijão-caupi tiveram seus DNA's extraídos e amplificados para a região Box A. O dendrograma da Figura 7 mostra o agrupamento dos 36 rizóbios distribuídos em 26 grupos com 50% de similaridade. Este resultado, assim como os resultados da caracterização morfológicos, demonstram que há uma grande diversidade de bactérias do grupo rizóbio associado à espécie *C. paraense*. A área Vila São Francisco 1 apresentou maior número de isolados diferentes genotipicamente, sendo 12 rizóbios distribuídos em nove grupos independentes, seguido da área Fazenda Novo Destino com 9 isolados em sete grupos, Fazenda Central com 5 isolados em cinco grupos, Fazenda Sr. Bacabeira com 6 isolados em três grupos e Fazenda Pau-rainha com 3 isolados em três grupos. As estirpes padrões formaram grupos independentes dos rizóbios isolados do pau-rainha e apenas o isolado bacteriano PR5-9 agrupou-se com a estirpe BR 322 de *Rhizobium tropici*. A maioria dos rizóbios isolados da área PR6 mostraram-se bastante semelhantes sendo reunidas no grupo 3 (figura 4).

Assim, a área Vila São Francisco 1 possui a maior diversidade de rizóbios, enquanto que a área da Fazenda Sr. Bacabeira apresenta pouca variedade dessas bactérias. Por um lado, a alta diversidade é extremamente desejável com indicador da qualidade ambiental do solo. Porém, segundo Pereira et al. (2007) a diversidade desses microrganismos nem sempre está relacionada à maior eficiência de fixação de N. A simbiose entre hospedeiros específicos e rizóbios nativos, em geral, refletem em menor diversidade e seleciona estirpes mais eficientes, afim de garantir o fornecimento adequado de N via FBN. No entanto, esta relação entre hospedeiro e rizóbios nativos em condições naturais precisa ser mais bem elucidada, principalmente na Amazônia cujas pesquisas neste sentido ainda são bastante reduzidas e a compreensão do comportamento da FBN em espécies de leguminosas arbóreas como a *C. paraense* ainda são incipientes.

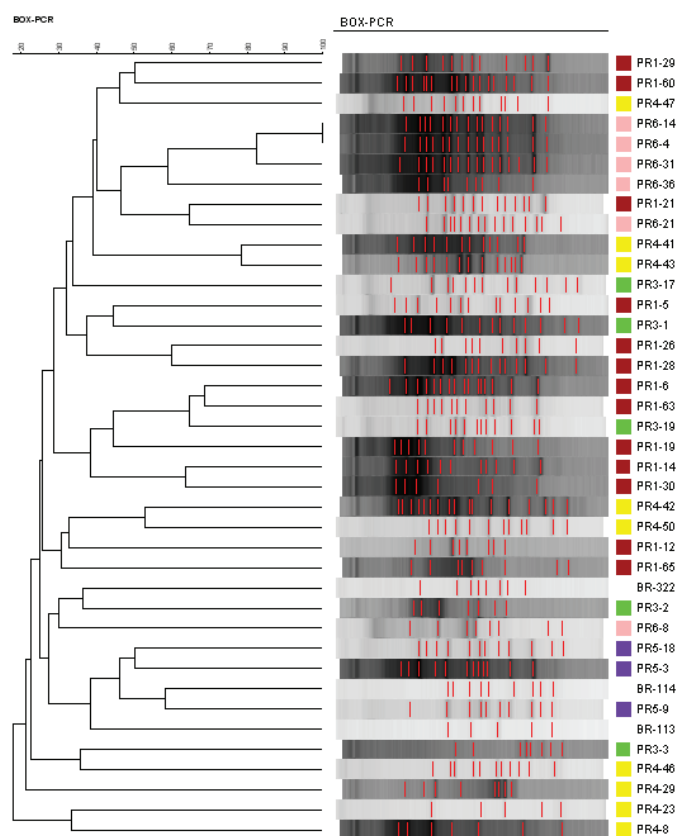


Figura 4. Dendrograma dos 36 isolados bacterianos com capacidade de nodular feijão-caupi gerados a partir dos perfis de banda obtidos pela técnica de BOX-PCR.

Considerações Finais

A savana de Roraima possui um conjunto de ecossistemas singulares na Amazônia. Uma dessas particularidades são as áreas de mata constituídas por várias espécies vegetais, animais e microrganismos, até então, pouco conhecidos e menos ainda seus potenciais explorados.

O presente estudo revelou a existência de uma grande diversidade de bactérias do grupo rizóbio nos solos de ilha de mata de Roraima capazes de se associar com a espécie *C. paraense*.

A caracterização morfológica em meio de cultura juntamente com a molecular pela técnica de BOX-PCR se mostrou eficiente para diferenciação de rizóbios capazes de nodular as raízes de pau-rainha, evidenciando uma predominância de estirpes de crescimento lento para esta leguminosa arbórea da Amazônia. O pioneirismo deste estudo da diversidade de rizóbios relacionados ao pau-rainha em solos de Roraima contribui com informações essenciais para estudos de seleção de estirpes eficientes que promovam a FBN para esta espécie.

Referências

- BARBERI, A.; CARNEIRO, M. A. C.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de minas gerais. **Cerne**, Lavras, v.4, n.1, p.145-153, 1998.
- CHADA, S. DE S.; CAMPELLO, E. F. C.; FARIA, S. M. DE. Sucessão vegetal em uma encosta reflorestada com leguminosas arbóreas em angra dos reis, RJ. **Revista Árvore**, Viçosa, v.28, n. 6, p.801-809, nov./dez. 2004.
- CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A. de; OLIVEIRA, A. N. de; WILLERDING, A. L. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 359-366, jan./mai. 2010.
- DIAS, P. F.; SOUTO, S. M.; RESENDE, A. S.; URQUILAGA, S.; ROCHA, G. P.; MOREIRA, J. F.; FRANCO, A. A. Transferência do N fixado por leguminosas arbóreas para o capim Survinola crescido em consorcio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 2, p. 352-356, mar/abr. 2007.
- FARIA, S. M. de. **Obtenção de estirpes de rizóbios para leguminosas florestais (aproximação de 2001)**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2001. 16 p. (Embrapa Agrobiologia. Documento, 134).
- FARIA, S. M. de; MOREIRA, J. F.; CORDEIRO, F. C.; MACHADO, R. L. **Obtenção de estirpes de rizóbios para leguminosas florestais (aproximação de 2004)**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 10 p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico, 61).
- FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E. F. C. Manejo nutricional integrado na recuperação de áreas degradadas e na sustentabilidade dos sistemas produtivos utilizando a fixação biológica de nitrogênio como fonte de nitrogênio In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L (Ed.). **Processos biológicos no sistema solo-planta – ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília: Embrapa, 2005. p. 201-220.
- HARA, F. A. dos S.; OLIVEIRA, L. A. de. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álcos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta amazônica**, Manaus, v.34, n. 3, p.343-357, Jul./Set. 2004.
- HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; MENNA, P.; BANGEL, E. V. **Caracterização genética de rizóbios e outras bactérias diazotróficas e promotoras de crescimento de plantas por BOX-PCR**. Londrina: Embrapa Soja, 2008. 12 p. (Embrapa Soja. Comunicado técnico 79).
- JACCARD, P. The distribution of flora in the alpine zone. **New Phytologist.**, v. 11, p. 37–50, 1912.
- KAMINSKI, P. E. **O pau-rainha (*Centrolobium paraense*): características, potencialidades e usos**. Boa Vista, RR: Embrapa Roraima, 2004. 31 p. (Embrapa Roraima. Documentos, 10).
- KAMICKER, B. J.; BRILL, W. J. Identification of *Bradyrhizobium japonicum* nodule isolates from Wisconsin soybean farms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.51, n.3, p.487-492, 1986.
- LOPES, L. A.; NASS, L. L.; MELLO, I. S. de. Bioprospecção. **Revista biotecnologia ciência e desenvolvimento**, Viçosa, v. 3, n. 34, p. 72-75, jan./jun. 2005.
- MARQUES, M. S.; PAGANO, M.; SCOTTI, M. R. M. M. L. Dual inoculation of a woodylegume (*Centrolobium tomentosum*) with rhizobia and mycorrhizal fungi in south-eastern Brazil. **Agroforestry Systems**, Netherlands, v. 50, n. 2, p.107-117, mai., 2001.
- MOREIRA, F. M. S. Nodulação e crescimento de 49 leguminosas arbóreas nativas da Amazônia em viveiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.21, n.4, 581-590, 1997.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras:UFLA, 2006. 729p.

NORRIS, D. O.; T'MANNETJE, L. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. Inrelation to their taxonomy and their agronomic use. **East African Agricultural and Forestry Journal**, v. 29, p. 214-235, 1964.

PEDREIRA, J. L.; MILLER, R. P.; PINHO, R. C. de; ALFAIA, S. **Manejo da rebrota de pau-rainha (*Centrolobium paraense* Tul – *Leguminosae*) nas roças e capoeiras da comunidade Mutamba, Terra Indígena Araçá, Roraima**. Disponível em: <www.sct.embrapa.br/cdagro/tema01/01tema22.pdf> . Acesso em: 17 mai. 2010.

PEREIRA, A. A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; KASCHUK, G.; CHUEIRE, L. M. de O.; CAMPO, R. J.; TARRES E. Variação qualitativa e quantitativa na microbiota do solo e na fixação biológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, n. 6, p. 1397-1412, nov. / dez. 2007.

REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Ecologia, isolamento e identificação de bactérias diazotróficas. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L (Ed.). **Processos biológicos no sistema solo-planta – ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília: Embrapa agrobiologia, 2005. p. 258-279.

SILVA, F.C. **Manual de análises química de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa comunicação para transferência de tecnologia, 1999. 370p.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W. H. Freeman e Cia, 1973. 573 p.

SOUZA, L. A. G. de; SILVA, M. F. da; MOREIRA, F. W. Capacidade de nodulação de cem leguminosas da Amazônia. **Acta Amazonica**, Manaus, v.24, n. 1, p. 9-18, jan. / jun. 1994.

STAMFORD, N. P.; SANTOS; C. E. R. S.; MEDEIROS, R.; FIGUEIREDO, M. V. B. Efeito de diferentes relações potássio magnésio no Jacatupé com inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 20, n. 1, p. 49-54, 1996.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodulate bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164 p.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RIBEIRO, J. R. de A.; Rumjanek, N.G. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. **Caatinga**, Mossoró, v.19, n.1, p.25-33, jan./mar. 2006.

Embrapa

Roraima

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PÁTRIA EDUCADORA